

FUSIONPROTEINS WITH PARTS OF IMMUNOGLOBULINS, THEIR PRODUCTION

Publication number: KR100249572 (B1)

Publication date: 2000-03-15

Inventor(s): LAUFFER LEANDER [DE]; OQUENDO PATRICIA [PE]; ZETTLMEISSL GERD [DE]; SEED BRIAN [US]

Applicant(s): GEN HOSPITAL CORP [US]; BEHRINGWERKE AG [DE]

Classification:

- international:

C07K14/195; A61K 38/00; A61K39/395; A61P7/04; A61P9/00;
 A61P13/12; A61P37/02; A61P37/08; C07K11/22; C07K14/005;
 C07K14/47; C07K14/505; C07K14/52; C07K14/53;
 C07K14/535; C07K14/54; C07K14/545; C07K14/55;
 C07K14/705; C07K14/71; C07K14/715; C07K14/745;
 C07K16/00; C07K19/00; C12N5/10; C12N9/64; C12N15/09;
 C12N15/62; C12P21/02; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/68;
 C12R1/51; C07K14/195; A61K38/00; A61K39/395; A61P7/00;
 A61P9/00; A61P13/00; A61P37/00; C07K1/00; C07K14/005;
 C07K14/435; C07K16/00; C07K19/00; C12N5/10; C12N9/64;
 C12N15/09; C12N15/62; C12P21/02; G01N33/15; G01N33/50;
 G01N33/68; (IPC1-7): C07K15/18

- European:

C12N9/64F2C21M90; C07K14/47; C07K14/505; C07K14/715F;
 C07K14/745; C07K16/00; C12N15/62

Application number: KR19910010844 19910628

Priority number(s): DE19904020607 19900628

Also published as:

EP0464533 (A1)

EP0464533 (B1)

UY25897 (A)

PT98113 (A)

PT98113 (B)

more >>

Abstract not available for KR 100249572 (B1)

Abstract of corresponding document: EP 0464533 (A1)

The invention relates to genetically engineered soluble fusion proteins consisting of human proteins or parts thereof not belonging to the immunoglobulin family and various portions of the constant region of immunoglobulin molecules. The functional properties of both fusion components are surprisingly retained in the fusion protein.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

제4도는 하이브리드 플라즈미드 pTF1Fc 5364를 도시한 것이다.

제5도는 IL-4 수용체 cDNA의 5'-비해독 영역 또는 암호화 영역에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 합성된 2개의 올리고뉴클레오타이드를 나타낸 것이다.

제6도는 하이브리드 플라즈미드 pIL 4Fc 5364를 도시한 것이다

제7도는 에리트로포이에틴(EPO) cDNA의 개시 코돈의 근처에 있는 서열 및 결지코돈의 근처에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 합성된 2개의 올리고뉴클레오타이드를 나타낸 것이다.

제8도는 하이브리드 플라즈미드 pEPoFc 5159를 도시한 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 사람 단백질 또는 이의 일부, 및 면역글로불린 분자의 불변부의 다양한 부분으로 이루어지는, 유전공학적으로 처리된 가용성 용할 단백질에 관한 것이다. 놀랍게도, 2개의 용할 파트너의 작용성 특성이 용할 단백질내에 보유된다.

유럽 공개특허공보 제0 325 262 호 제0 314 317호에는 사람 T 세포의 CD4 막 단백질의 다양한 도메인(domain) 및 사람 IgG1 부분으로 이루어진 이에 상응하는 용할 단백질이 기술되어 있다. 이들 용할 단백질 중 몇몇은 세포-결합인 CD4 분자와 동일한 친화도로 사람 면역결핍 바이러스의 당단백질 gp120에 결합한다. CD4 분자는 면역글로불린 계통군에 속하므로, 결과적으로 면역글로불린 분자의 구조와 매우 유사한 3차 구조를 갖는다. 이러한 유사한 3차 구조는 또한 T-세포 항원 수용체의 α-쇄에 대해서도 적용되는데, 이러한 용할이 또한 다음 문헌에 기술되어 있다[참조: Gascogne 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84(1987), 2937-2940]. 그러므로, 매우 유사한 도메인 구조에 근거하여, 이 경우에, 용할 단백질에서의 2개의 용할 파트너의 생물학적 활성의 보유가 예상되었다.

바람직하게는, 면역글로불린의 불변부의 아미노 말단에 커를형되어 있는, 본 발명에 따른 사람 단백질은 면역글로불린 계통군에 속하지 않으며 하기 부류, 즉(i) 세포의 도메인이 용할에서 전적으로 또는 부분적으로 혼입되어 있는 막-결합 단백질(특히, 트롬보스플라스틴 및 시토킨 수용체 및 성장 인자 수용체(예: 인터루킨-4, 인터루킨-7, 종양괴사인자, GM-CSF, G-CSF, 에리트로포이에틴에 대한 세포수 수용체)가 있다. (ii) 용할에서 전적으로 또는 부분적으로 혼입되는 막-결합되지 않은 가용성 단백질로 나누어진다. 특히, 치료학적 중요한 단백질은 예를 들어, 에리트로포이에틴 및 기타 성장 인자들이다.

용할 단백질은 공지의 전핵 및 전핵 발현 시스템에서 제조될 수 있지만, 바람직하게는 포유동물 세포(예: CHO, COS 및 BHK 세포)에서 제조될 수 있다.

본 발명에 따른 용할 단백질은 그들의 면역글로불린 부분 때문에, 친화 크로마토그래피에 의해 정제하기가 용이하며 생체내에서 개선된 약물동력학적 특성을 갖는다.

많은 경우에서, 용할 단백질에서의 Fc 부분은 치료 및 진단에서 사용하기에 상당한 유리하므로, 예를 들어, 개선된 약물동력학 특성을 초래한다[참조: 유럽 공개특허공보 제0 232 262호]. 한편, 이의 용도를 위해서는, 용할 단백질을 발현시키고 합성하고 정제한 후에 기술된 유리한 방법으로 Fc 부분을 제거하는 것이 바람직할 것이다. 이것은 Fc 부분이 치료 및 진단에서 사용하기에는 방해물임이 입증되는 경우, 예를 들어, 용할 단백질이 면역반응에서 항원으로서 사용되는 경우에 해당된다.

상기 목적을 위해 사용하는 것이 가능할 수 있는, 현존의 다양한 프로테아제가 있다. 예를 들어, 면역글로블린으로부터 F(ab) 단편을 생성시키기 위해 파파인 및 펩신이 사용되지만[참조: Immunology, ed. Roitt, I. 등, Gower Medical Publishing, London(1989)], 이들은 특정하게 특이적 방식으로 절단하지는 않는다. 대조적으로 용할인자 Xa는 단백질에서 비교적 최거한 테트라펩티드 서열 Ile-Glu-Gly-Arg를 인지와 이로부터 잔기 다음에 단백질의 가수분해적 절단을 수행한다. 언급된 테트라펩티드를 함유하는 서열은 나가이(Nagai) 및 토게르센(Thogersen)에 의해 유전 공학적 방법으로 하이브리드 단백질에 최초로 도입되었다[참조: Nagai, K. 및 Thogersen, H.C., Nature, vol. 309(1984), 810-812]. 상기 저자들은 이 물리에서 발현된 단백질이 실질적으로 인자 Xa에 의해 특이적으로 절단되는 것을 보여줄 수 있었다. 하지만, 이러한 단백질이 또한 전핵세포, 특히, 동물세포에서 발현되어 정제후에 인자 Xa에 의해 절단되는 가능성에 대해서는 아직까지 공개된 예가 없다. 그러나 동물 세포에서의 본 발명에 따른 단백질의 발현이 바람직하게, 이는 상기 타입의 세포 시스템에서만, 예를 들어, 정성후에, 천연 또는 합성 용할로 생물학적 활성을 보유한 용할 파트너로서 막-결합 수용체의 분리가 예상되기 때문이다. 세포 배양 상층액으로의 분리는 용할 단백질의 후속의 간단한 정제를 촉진시켜준다.

따라서, 본 발명은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 사람 단백질 또는 이의 일부, 및 여러가지 종류의 면역글로블린(IgG, IgM, IgA, IgE)의 중쇄 또는 경쇄의 불변부의 다양한 부분으로 구성된, 유전공학적으로 처리된 가용성 용할 단백질에 관한 것이다. 사람 IgG, 특히 바람직하게는 사람 IgG1의 중쇄의 불변부 면역글로불린으로서 바람직하며, 여기서 용할은 힌지영역(hinge region)에서 발산한다. 특정 암터에서, Fc 부분은, 또한 혼입되는 용단 서열에 의해 간단한 방법으로 제거될 수 있고 인자 Xa를 사용하여 절단될 수 있다.

또한, 본 발명은 유전공학적으로 상기 용할 단백질을 제조하는 방법, 및 진단과 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

최종적으로, 본 발명은 후가의 실시예에서 설명된다.

[실시예 1]

트롬보스플라스틴 용할 단백질:

응답은 인체에서 가장 중요한 과정이다. 응답 캐스캐이드(cascade)의 적당하게 예민한 조종이 있는데, 여기에는 다수의 세포성 인자와 혈장 단백질이 함께 작용한다. 전체로서의 상기 단백질(및 이의 보조인자들)이 응답인자로 불리워진다. 응답 캐스캐이드의 최종 생성물은 혈소판의 응집을 유발시키는 트롬빈, 및 혈소판 혈전을 안정화시키는 파브리닌이다. 트롬빈은 파브리노겐으로부터의 파브리닌의 형성을 촉매하여 스로몬은 프로트롬빈의 제한된 단백질 분해에 의해 형성된다. 활성화된 인자 X(인자 X_a)는 상기 단계에 관여하여, 인자 Va 및 칼슘 이온의 존재하에서, 혈소판 막에 결합하여 프로트롬빈을 절단시킨다.

인자 X가 활성화되기 위해서는 2가지 경로, 즉, 외성 경로와 내성 경로가 존재한다. 내성 경로에서는, 일련의 인자들은 단백질 분해에 의해 활성화되어 그들 각각이 활성 프로테아제를 형성한다. 외성 경로에서는, 손상된 세포에 의해 트롬보플라스틴(조직 인자)의 합성이 증가되고, 증가된 트롬보플라스틴이 인자 VIIa 및 칼슘 이온과 함께 인자 X를 활성화시킨다. 트롬보플라스틴의 활성화는 상기 반응에만 한정된다 그 앞서 가졌던 것이다. 그러나, 트롬보플라스틴(VIIa) 복합체는 또한 인자 IX의 수준에서 내성 경로를 활성화시키는 것을 방해한다. 따라서, 트롬보플라스틴/VIIa 복합체는 응혈의 가장 중요한 생리학적 활성화제 중의 하나이다.

그러므로, 트롬보플라스틴은 이의 진단 보조제(하기 참조)로서의 용도와는 별도로, 선천성 또는 후천성 응혈 결핍증을 치료하기 위한 치료학적 약제의 성분으로서 또한 사용될 수 있다고 생각할 수 있다. 이러한 예는 인자 VIII, IX 또는 XI의 결핍에 의해 야기되는 만성 혈우병 또는, 예를 들어, 간 또는 신장 질병의 결과로 초래되는 그 밖의 급성 응혈 장애이다. 외과 수술 개입후의 치료학적 약제로서의 용도를 또한 생각할 수 있다.

트롬보플라스틴은 면역글로불린 계통군에 속하지 않는 온전한 막 단백질이다. 트롬보플라스틴 cDNA 서열은 총 4개의 그룹에 의해 공개되었다[참조: Fisher 등, *Thromb. Res.*, vol. 48(1987), 89-99; Morrissey 등, *Cell*, vol. 50(1987), 129-135; Scarpati 등, *Biochemistry*, vol. 26(1987), 5234-5238; Spicer 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84(1987), 5148-5152]. 트롬보플라스틴은 cDNA는 295개 아미노산 잔기의 open reading frame을 암호화하고, 이의 32개의 N-말단 아미노산이 시그널 펩티드로서 작용하는 개방 막단 프레임(free readin frame)을 함유한다. 성숙한 트롬보플라스틴은 263개의 아미노산 잔기를 포함하고 3개-도메인 구조, 즉 i) 아미노 말단 세포외 도메인(219개의 아미노산 잔기); ii) 막횡단 영역(23개의 아미노산 잔기); iii) 세포질 도메인(카복실 말단, 21개의 아미노산 잔기)을 갖는다. 세포외 도메인의 A, N-글리코실화를 위한 3개의 포맨실 부위가 존재한다(Asn-X-Thr). 트롬보 플라스틴은 정상적으로 글리코실화되지만 글리코실화는 단백질의 활성을 위해 필수적인 것으로 보이지는 않는다[참조: Paborsky 등, *Biochemistry*, vol. 29(1989), 8072-8077].

트롬보플라스틴은 응혈의 진단상 시험에서 혈장 샘플에 대한 보조제로서 요구된다. 시험법은 환자의 응혈 상태를 1-단계 프로트롬빈 형성 형성 시간 결정에 의해 알 수 있다(예: Quick's test). 진단상 시험에 요구되는 트롬보플라스틴은 현재 사항 조작으로부터 획득하며, 제조방법은 표준화하기 어렵고, 수율은 낮아서 상당한 양의 사항 출혈물질(대변)이 공급되어야 한다. 한편, 천연의 막-결합 트롬보플라스틴의 유전 공학에 의한 제조는 복잡한 정제 방법 때문에 또한 어려움을 겪어야 예상된다. 상기 문제점들은 면역글로불린 부분으로서 본 발명에 따른 융합에 의해 회피될 수 있다.

본 발명에 따른 트롬보플라스틴 융합 단백질은 포유동물 세포(예: CHO, BHK, COS 세포)에 의해 발양 배지로 분비되고 단백질 A-세파라토스에서의 친화 크로마토그래피로 정제되며 1-단계 프로트롬빈 형성 형성 시간 결정에서 놀랍게도 높은 활성을 갖는다.

트롬보플라스틴 cDNA의 클로닝

공개된 서열[참조: Scarpati 등, *Biochemistry*, vol. 26(1987), 5234-5238]을 트롬보플라스틴 cDNA를 클로닝하는데 사용한다. 2개의 올리고뉴클레오타이드 프로브 분자(제1도 참조)가 이들 공개된 서열로부터 유도된다. 상기 2개의 프로브 분자는 사항 대본으로부터 cDNA 발크를 스크리닝하는 데 사용한다[참조: Grundmann 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 83(1986), 8024-8028].

다양한 길이의 cDNA 클론을 수득한다. 후속의 과정에서 사용되는 하나의 클론인 2b-Apr5는 쇼크파티드(Scarpati)등에 의해 기술된 cDNA와 동일한 아미노산 서열을 암호화한다.

트롬보플라스틴 융합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라스미드 pTF1Fc의 작제

플라스미드 pCD4E 감마 1[유전 공개특허공보 제0 325 262 A호; ATCC에 수탁번호 제67610호로 기록되어 있음]을 사항 CD4 세포 및 사항 IgG1으로 구성된 융합 단백질을 발현시키는데 사용한다. CD4의 세포외 도메인을 암호화하는 DNA 서열은 제한 효소 Hind III 및 BamHI를 사용하여 상기 플라스미드로부터 제거한다. 이 경우에서, 단지 부분적 절단만을 효소 HindIII를 사용하여 수행하여, pCD4E 감마 1에 함유되어 있는 2개의 HindIII 부위중 단지 1개(위치 2198)만을 절단해야 한다. 결과로 전핵세포 전사조절서열(프로모터)이 개방 HindIII 부위에 이어지는 개방된 벡터에 초래된다. 개방 BamHI 부위는 판타-펩티드 링커를 위한 암호화 영역의 출혈점에 위치하고 환자나 사항 IgG1의 C_{H2} 및 C_{H3} 도메인이 그뒤에 이어진다. BamHI 인자 서열 GGATCC에서 판독 프레임은 GAT가 아사파르탄산으로 해독되도록 하는 것이다.

열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 DNA 증폭은 복작하는 서열이 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 부착되도록 하는 방식으로 소정의 서열을 변형시킬 수 있다. 트롬보플라스틴 cDNA의 5'-비-암호화 영역(A: 5' GATCGATTAAAGCTCGGGAACCCGCTGGATCTGCGCGCC 3') 또는 암호화 영역(B: 5' GCATATCTGATCCCGCTAGAAATTTCTCTGAATCCCC 3')에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 2개의 올리고뉴클레오타이드를 합성한다. 이들중에서, 올리고뉴클레오타이드 A는 암호화체의 서열과 부분적으로 동등하거나 올리고뉴클레오타이드 B는 비-암호화체와 부분적으로 동등성이다(제3도 참조).

그러하고, 증폭을 통해(암호화체를 기준으로 하여) 암호화 서열의 출혈점정의 5' 말단에 있는 HindIII 부위 및 막횡단 영역의 첫번째 3개의 아미노산 잔기를 위한 코돈후의 3' 말단에 있는 BamHI 부위를 함유하는 DNA 단편(827 bp)을 수득한다. BamHI 절단 부위에 있는 판독 프레임은 pCD4E 감마 1에 있는 BamHI 부

위와와 연결되어 트롬보플라스틴 cDNA의 개시 코돈에서부터 IgG1 종새의 절지코드에서 연속적인 판독 프레임과의 유전자 융합을 추래하도록 하는 것이다. 역적하는 단편을 수득하고 HindIII 및 BamHI으로 처리한 후, 상기와 같이 HindIII(부분적으로) 및 BamHI으로 절단시킨 벡터 pCD4E 감마 1으로 연결시킨다. 생성된 플라스미드를 pTF1Fc라고 명명한다(제4도 참조)

포유동물 세포로의 pTF1Fc의 형질감염

플라스미드를 pTF1Fc에 의해 암호화된 융합 단백질은 이후로 pTF1Fc로 명명한다. pTF1Fc는 COS 세포에서 일시적으로 발현시킨다. 이 목적을 위해, COS 세포를 DEAE-셀프스트란의 보호하에 pTF1Fc로 형질감염시킨다[참조: 유일 골게특허공보 제0 325 262호]. 간접 면역형광 검사는 형질감염된 세포의 비늘이 약 25% 정도 나타내었다. 형질감염시킨지 24시간 후에, 세포를 멸균없는 배지로 옮긴다. 이 세포 상층액을 3일 이 더 지난 후에 수거한다.

세포 배양 상층액으로부터 pTF1Fc 융합 단백질의 정제

일시적으로 형질감염된 COS 세포로부터의 상층액 170ml을 0.8ml의 단백질 A-세파로즈를 함유한 컬럼에서 배지 발반으로 4℃에서 밤새 수렴하고, 10배 용적의 세척 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 8.6), 150mM NaCl)으로 세척하고 융합 완충액(93:7 100mM 시트르산: 100mM 시트르산 나트륨을 사용하여 0.5ml의 분획으로 융합시킨다. 처음의 9개 분획을 각 경우마다 2배 트리스 완충액(pH 8.6) 0.1ml을 사용하여 즉시 중화시료를 혼합하여, 생성된 단백질을 아미온 미소농축기(Amicon microconcentrator)(Centricon 30)에 수 3회 농축/희석 주기를 수행함으로써 TNE 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 7.4), 50mM NaCl, 1mM EDTA)으로 옮긴다. 이런 방법으로 수득된 pTF1Fc를 SDS-PAGE 전기영동에 의해 정제한다[참조: U.K. Lammli, Nature 227(1970) 680-681]. 환원재의 부재하에서, pTF1Fc는 SDS-PAGE에서 아랑색(약 165kDa)처럼 나타낸다.

프로테오민 열병 형성 시간 결정에서 정제된 TF1Fc의 생물학적 활성

TF1Fc 융합 단백질은 1-단계 프로테오민 열병 형성 시간 결정에서 낮은 농도(50ng/ml 미만)에서 활성이 있다[참조: Vinazzer, H. Gerinnungsphysiologie und Methoden im Blutgerinnungslabor(1979), Fisher Verlag Stuttgart]. 열성된 열병 형성 기간은 사망 대반으로부터 분리된 트롬보플라스틴을 사용한 경우 수득한 열병 형성 시간과 비교한다.

[실시예 2]

인테루린-4 수용체 융합 단백질

인테루린(IL-4)는 T 세포에 의해 합성되며 B-세포 증식을 자극할 수 있기 때문에 초기에는 B-세포 성장 인자로 명명되었다. 인테루린(IL-4)는 상기 세포들에게 많은 영향을 끼친다. 특히 항지지는 활성화된 B 세포에서 면역글로블린 아류인 IgG1 및 IgE의 분자의 합성을 자극하는 것이다[참조: Coffman 등, Immunol. Rev., vol. 102(1988) 5]. 또한, IL-4는 T 세포 및 기타 헤모포이에틱 세포(hemopoietic cell)의 증식 및 분화를 조절한다. 그리하여, 알레르기성 반응 및 기타 면역학적 반응의 조절에 기여한다. IL-4는 특정 수용체에 높은 친화도를 가지고 결합한다. 상할 IL-4를 암호화하는 cDNA가 분리되었다[참조: Idzerda 등, J. Exp. Med., vol. 171(1990) 861-873]. IL-4 수용체가 시그널 펩티드로서 작용하는 25개의 N-말단 아미노산을 갖는 총 825개의 아미노산으로 구성되어 있다는 것이 cDNA 서열로부터 추론된 아미노산 서열의 분석으로부터 명백하다. 성숙한 사람 IL-4 수용체는 800개의 아미노산으로 구성되어 트롬보플라스틴 처럼 3개-도메인 구조, 즉 i) 아미노 말단 세포외 도메인(207개의 아미노산); ii) 막횡단 영역(24개의 아미노산); 및 iii) 세포질 도메인(569개의 아미노산)을 갖는다. 세포외 도메인에는, N-글리코실화를 위한 6개의 표점성 부위가 존재한다(Asn-X-Thr/Ser). IL-4 수용체는 사람 IL-4 수용체, 사람 IL-2 수용체와 B-세포 유닛, 마우스 에리트로포이에틴 수용체 및 래트 프로락틴 수용체와 동질성을 갖는다[참조: Idzerda 등, loc. cit.]. 그리하여, 트롬보플라스틴처럼, 면역글로블린 계통군의 일원이 아니고 헤마토포이에틴 수용체의 신규 계통군으로 언급되는 동종성 단백질과 함께 합당된다. 상기 계통군의 일원은 4개의 시스테인 잔기를 가지며 통상 막횡단 영역 근처에 위치하는 세포외 도메인에 보존 서열(Trp-Ser-X-Trp-Ser)을 갖는다.

IL-4/IL-4 수용체 시스템의 상기 언급된 작용을 근거로 하여, IL-4 중개된 면역 반응(예: 이식 거부 반응, 자가면역질환, 알레르기성 반응)을 억제하기 위한 IL-4 수용체의 재조합 형태의 치료학적 용도가 가능하다.

치료하기 위해 요구되는 물질의 양은 유전적학적으로 이러한 분자를 제조하는 것이 필수적이며, 한다. 친화 크로마토그래피에 의한 간단한 정제 및 개선된 약물동력학적 특성으로 인해, 본 발명에 따른, 면역 글로블린 동량 단백질로서의 가용성 형태의 IL-4 수용체의 합성은 특히 유리하다.

IL-4 수용체 융합 단백질은 포유동물 세포(예: CHO, BHK, COS 세포)에 의해 배양 배지로 분리되고 단백질 A-세파로즈상에서 친화 크로마토그래피에 의해 정제되며, 놀라게도, 온전한 막-결합 IL-4 수용체 분자의 세포외 도메인과 동일한 작용성 특성을 갖는다.

IL-4 수용체 융합 단백질을 암호화하는 하이브리드 플라스미드 pIL-4Fc의 작제

플라스미드 pCD4E 감마 1을 XhoI 및 BamHI을 사용하여 절단하여 개방 XhoI 부위가 프로모터 서열로부터의 하부에 위치하는 개방된 벡터를 초대한다. 개방 BamHI 부위는 캔다펩티드 링커를 위한 암호화 영역의 출발점에 위치하고 힌지와 사람 IgG1의 CH2 및 CH3 도메인이 그위에 이어진다. BamHI 인지 서열 GGATCC에서 판독 프레임은 GAT가 아파라트상으로 해독되도록 하는 것이다. 열안정성 ONA 인지 서열을 사용한 ONA 증폭은 목적하는 서열이 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 부작위하도록 하는 방식으로 소량의 서열을 변형시킬 수 있다. 벡터 pCG302/T22-8[참조: Idzerda 등, loc. cit.]에서 클론된 IL-4 수용체 cDNA의 5'-비하트 영역(A: 5' GATCCAGTACTCGAGAGAGAAGCGGGCGTGGTGGCTCATGC 3') 또는 암호화 영역(B: 5' CTATGAGATGGATCCTGCTGAGAGGCGTCCCTGTAGAGAGTTGTG 3')에 있는 서열과 하이브리드화 할 수 있는 2개의 올리

고뉴클레오타이드를 합성한다. 이들중에서, 올리고뉴클레오타이드 A는 양호화체의 서열과 부분적으로 동중성이고 올리고뉴클레오타이드 B는 비-양호화체와 부분적으로 동중성이다(제5도 참조). 열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 증폭은 양호화체를 기준으로 하여, 양호화 서열의 출발점 전의 5' 말단에 있는 XhoI 부위 및 서열과 도메인의 마지막 코돈전의 3' 말단에 있는 BamHI 부위를 향하여 DNA 단편(836 bp)을 초래한다. BamHI 절단 부위에 있는 판독 프레임은 pCD4E 감마 1에 있는 BamHI 부위와의 연결이 IL-4 수용체 cDNA의 개시 코돈에서부터 IgG1의 중쇄의 정지코돈에 걸쳐 연속적인 판독 프레임과의 유전자 융합을 초래하도록 하는 것이다. 목적하는 단편을 수득하고, XhoI 및 BamHI으로 처리한 후, 상기와 같이 XhoI/BamHI으로 절단시킨 벡터 pCD4E 감마 1에 연결시킨다. 생성된 플라스미드를 pIL4Fc라고 명명한다(제6도 참조).

포유동물 세포로의 pIL4Fc의 형질감염

폴리머리드들 pIL4Fc에 의해 양호화된 융합 단백질들은 이후로 pIL4Fc로 명명한다. pIL4Fc는 COS 세포에서 임시적으로 발현시킨다. 이 목적을 위해, COS 세포를 OCAE- 엑스트란의 보조하에 IL4Fc로 형질감염시킨다[참조: 유람 공개특허 공보 제0 325 282호]. 간접 면역형광법 조사는 형질감염된 세포의 비율이 약 25%임을 나타내었다. 형질감염시킨지 24시간 후에, 세포를 얼렸없는 배지로 옮긴다. 이 세포 상층액을 추가의 3일 후에 수거한다.

세포 배양 상층액으로부터 pIL4Fc 융합 단백질의 정제

임시적으로 형질전환된 COS 세포로부터의 500ml의 상층액을 1.6ml의 단백질 A-세파로즈를 함유한 컬럼에서 매지 방법으로 4°C에서 밤새 수렴하고, 10배 용적의 세척 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 8.5), 150mM NaCl)으로 세척하고 용출 완충액(93:7 100mM 시트르산 나트륨)을 사용하여 0.5ml의 분획으로 용출시킨다. 처음의 9개 분획을 각 경우마다 2M 트리스 완충액(pH 8.6) 0.1ml를 사용하여 즉시 중화시킨후 혼합하여, 생성된 단백질을 아미온 미소분리기(Centricon 30)에서 3회 농축/희석 주기를 수행함으로써 TNE 완충액(50mM 트리스 완충액(pH 7.4), 50mM NaCl, 1mM EDTA)으로 옮긴다. 이런 방법으로 수득한 IL4Fc를 SOS-PAGE 전기영동에 의해 정제한다[참조: U.K. Lammi, Nature 227(1970) 680-685]. 환원제의 부재하에서, IL4Fc는 SOS-PAGE에서 이량체(약 150KDa)처럼 나타난다.

정제된 IL4Fc의 생물학적 활성

IL4Fc 단백질은 막-결합된 온전한 IL-4 수용체와 동일한 친화도($K_D = 0.5nM$)로 ¹²⁵I-방사선 표지된 IL-4에 결합한다. IL4Fc 단백질은 10 나지 1000ng/ml 농도에서 IL-4-의존성 세포주 CTLHIL-4RI 클론 [참조: Izderza 등, loc. cit.]의 증식을 억제한다. 또한, IL4Fc 단백질은, 예를 들어, 라비피 항-사랑 IgG로 미리 표백된 미세액가 플레이트에 Fc 부분을 경유하여 결합될 수 있고 또한 상기 형태에서 높은 친화도를 가지고 이의 리간드와 결합하기 때문에, IL-4 결합 경로를 개선시키는데 있어서 탁월하게 적합하다.

[실시예 3]

에리트로포이에틴 융합 단백질

성숙한 에리트로포이에틴(EPO)은 166개 아미노산으로 구성된 당단백질이고 적혈구의 발달에 필수적이다. 이것은 적혈구의 전구체 세포의 성숙 및 말단 분화를 자극한다. 사람 EPO에 대한 cDNA가 클론되었으며[참조: Izderza 등, loc. cit.]의 증식을 억제한다. 이것은 성숙한 EPO의 166개의 아미노산 및 분비에 필수적인 22개의 아미노산의 시그널 펩티드를 양호화한다. cDNA는 유전자 조작된 포유동물 세포에서 재조합 작용성 EPO를 제조하는데 사용될 수 있으며 EPO는 다양한 원인의 빈혈증상(예: 급성 신부전증과 연관된 증상)의 치료를 위해 임상학적으로 사용될 수 있다.

간단한 정제 및 개선된 약물동력학적 특성 때문에, 본 발명에 따른 면역글로불린 융합 단백질로서의 EPO의 합성은 특히 유리하다.

에리트로포이에틴 융합 단백질을 양호화하는 하이브리드 플라스미드 pEPOFc의 작제

이 작제는 실시예 2(작성: IL-4 수용체 융합 단백질을 양호화하는 하이브리드 플라스미드 pIL-4Fc의 작제)에 기술된 것과 유사하게 수행한다. 벡터 pCES[참조: 유람 공개특허 공보 제0 267 678호]에서 클론된 EPO cDNA의 개시코돈의 근처에 있는 서열(A: 5' GATCGATCTCGAGTGGGGGTGCAGGAATGCTGCTGGCTGGTGTGG 3') 및 정지코돈의 근처에 있는 서열(B: 5' CTGGAATCGGATCCCTGTCTCGAGGCTCCCGTGTGTACAG 3')와 하이브리드화 할 수 있는 2개의 올리고뉴클레오타이드를 합성한다. 이들중에서, 올리고뉴클레오타이드 A는 양호화 체의 서열과 부분적으로 동중성이고 올리고뉴클레오타이드 B는 비-양호화체와 부분적으로 동중성이다(제7도 참조). 열안정성 DNA 폴리머라제를 사용한 증폭은 양호화체를 기준으로 하여, 개시코돈의 앞쪽의 5' 말단에 있는 XhoI 부위를 향하여 DNA 단편(598 bp)을 초래하는데, 여기서, EPO의 두 번째의 C-말단 아미노산 잔기에 대한 코돈(Asp)이 3' 말단에 BamHI 인지 서열로 존재한다. BamHI 절단 부위에 있는 판독 프레임은 pCD4E 감마 1에 있는 BamHI 부위와의 연결이 EPO cDNA의 개시 코돈에서부터 IgG1의 중쇄의 정지코돈에 걸쳐 연속적인 판독 프레임과의 유전자 융합을 초래하도록 하는 것이다. 목적하는 단편을 수득하고, XhoI 및 BamHI으로 처리한 후, 상기와 같이 XhoI/BamHI으로 절단시킨 벡터 pCD4E 감마 1에 연결시킨다. 생성된 플라스미드를 pEPOFc라고 명명한다(제8도 참조).

(57) 청구의 범위

청구항 1

IL-4 수용체, IL-7 수용체, G-CSF 수용체, GM-CSF 수용체 및 에리트로포이에틴 수용체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 시트린 수용체 또는 성장 인자 수용체의 세포와 부분 또는 이의 일부, 및 IgG, IgM, IgA 및 IgE로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 면역글로불린 분자의 불변부로 이루어진 가용성 융합 단

도면2a

```

10          30          60
GCCCCCTCGAGTGCAGCTGATGATAGCTGATGATGAATTTCTCTCGGCAACCC
70          90          110
CTCGACTCTCTCTGCGGCCAGGCGCTTCAAGCCAACTCCCGAGCCACGCGC
130         150         170
GCCAGGAACCCCTCGATCTGCGCGCAACTGATGACGTGAGACCCCTGCTGCGCC
Hs61aThrProAlaTrpPro
190         210         230
CGGTCCGCGGCCCGAGACCGCTGCTCTGGACGCTCTCTCTGAGTGGGCTCTGCGC
ArgValProArgProGluThrAlaValAlaArgThrLeuLeuGlyTrpValPheAla
250         270         290
CAGTGGCCCGGCTCTCAGGCCTACAAATCTGTGCGAGCATTAATTTAACTTGGAAA
GlnAlaAlaGlyAlaSerGlyThrAsnThrValAlaAlaTyrAsnLeuThrTrpLys
310         330         350
TCACTAATTTCAAGACANTTTGGATGGGAACCAAGCCGTCANTCAAGTCTACACT
SerThrAsnPheLysThrIleLeuGluTrpGluProLysProValAlaGlnValTyrThr
370         390         410
GTTCAATATAGCACTAAGTCAAGAGATTGGAAAGCAATGCTTTACACACAGACACA
ValGlnIleSerThrLysSerGlyAspTrpLysSerLysPheTyrThrAspThr
430         450         470
GAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAGGATGTGAGGACAGACTTGGACGGGTC
GluCysAspLeuThrAspGluIleValLysAspValLysGlnThrTyrLeuAlaArgVal
490         510         530
TTCTCTACCGCGAGGAGATGGAGAGACCGTCTCTCTGGAGGCTCTGTATGAG
PheSerTyrProAlaGlyAsnValIleSerThrLysAlaGlyGluProLeuTrpGlu
550         570         590
AACTCCCGAGGTTCAACCTTACCTGGACGCAAACTCGGACGCGCAACATTGCAAGT
AsnSerProGluPheThrProTyrLeuGluThrAsnLeuGlyGlnProThrIleGlnSer

```

도면2b

```

610         630         650
TTTGAACAGTGGGAACAAAGTCAATGTGACCTAGAGATGAACGCACTTTATGAGA
PheGluGlnValGlyThrLysValAsnValThrValGluAspGluArgThrLeuValArg
670         690         710
AGGAACAACACTTCTCTAAGCTCCGGATGTTTTTGGCAGGCACTAATTTATACACT
ArgAsnAsnThrPheLeuSerLeuArgLysValPheGlyLysAspLeuIleTyrThrLeu
730         750         770
TATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAGAAAGAACAGCCAAACAAACACTAAGTTT
TyrTyrTrpLysSerSerSerSerGlyLysThrAlaLysThrAsnThrAsnGluPhe
790         810         830
TTGATTGATGGGTAAGGAGAAACACTGTTTTCAGTGTTCAGCACTGATTCCTCTCC
LeuIleAspValAspLysGlyGluAsnTyrCysPheSerValGlnAlaValIleProSer
850         870         890
CSAACAGTTAACCGGAGAGATACAGACCCCGTAGAGTGTATGGCCGAGGAGAAAGG
ArgThrValAsnArgLysSerThrAspSerProValGluCysMetGlyGlnLysGly
910         930         950
GAATTCAGAGAAATTTACATCAATTGGAGCTGTGTTATTTGTGTCATCACTCTGTG
GluPheArgGluIlePheTyrIleIleTyrAlaValPheAlaValIleLeuVal
970         990         1010
ATCATCTGGCTATATCTCTACAGAGTTGAGAAAGGACGAGTGGGACAGCTGGAG
IleIleLeuAlaIleSerLeuHisLysCysArgLysAlaGlyValGlyGlnSerTrpLys
1030        1050        1070
GAGAACTCCCACTGAATGTTTCATAAAGGACGACTTTGGAGCTACTCGCAATGCTAT
GluAsnSerProLeuAsnValSer
1090        1110        1130
ATTGCACTGTGACCGAGACTTTTAAAGGATAGATACATGGAACGCAATGAGTATT
1150        1170        1190
TCGGAGCATGAGACCTTGAGTTCAAAAATCTTGATGACCTGTTATTACCATTA

```


도면2c

1210	1230	1250
CATCTGCTTTTGACATCAGCATTAATGTCACCTTTGAAATGTAACGAATGGTACTACACCA		
1270	1290	1310
ATTCCAGTTTTTAATTTTAAACACATGGCACCTTTTGACATAGCATGCTTTAATAT		
1330	1350	1370
ATATTCGCGACTTAAGGATTAACGAGTGTCTCGAGCAAAACAAATGGGAAATGTCTT		
1390	1410	1430
AAAAATCCTGGTGGACCTTTTBAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGACAGGATC		
1450	1470	1490
TTGCTCTGTTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTATGACAGATCTCGCTCACTTGGACCCCTGCT		
1510	1530	1550
CTCTCGGTTTCAGCAATTTCTCTGCTTCAGCTCTCCGAGTAGCTGGATTACAGGTGCTG		
1570	1590	1610
ACTACAGCCAGCTAAATTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGTTTCACCATCTTGGC		
1630	1650	1670
CAGGCTGGTCTTGAATCTTGACCTCAGTGAATCCAGCCAGCTTGGCTCCCAAGATGCT		
1690	1710	1730
AGTATTATGGGCTGAACACCATGCCAGCCGAAAGCTTTTGAAGGCTGACTTCAAT		
1750	1770	1790
CCATGTAGGAAGTAAATGGAGGAATTTGGTGCATTTCAGGACTTTCTAATCATAT		
1810	1830	1850
GTCTATAATATAGTGTTAGGTCTTTTTTTTCAGGAATCAATTTGGAAATCAAAAC		
1870	1890	1910
AATTGGCAAACTTTGTATTATGTGTTAAGTGCAGAGACATTGTATTCTGGGAGCT		

도면2d

1930	1950	1970
TCCTAATATGCTTTACAATCTGCACCTTTAACTGACTTAAGTGGCATTAAACATTTGAGAG		
1990	2010	2030
CTAATATATTTTATAGACTACTATACAACCTACAGAGTTTATGATTTAAGGTACTTA		
2050	2070	2090
AAGCTCTATGTTGACATTGTATATATAATTTTTAAAGGTTTTCTATATGGGGAT		
2110	2130	2150
TTTCATTTATGTAGGTAAATATGTCTATTGTATATATTGACATAATTTATTTAATAT		
2170		
ACCTTAATAAAGGTGACTGGGAATTTT		

